Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Göttingen.
Direktor: Prof. Dr. Erich Meyer.

Sind in der Dünndarmschleimhaut Bakterienwachstum hemmende Stoffe nachweisbar?

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Georg-August-Universität
zu Göttingen

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Friedrich Wilhelm Radel
aus Polzin i. Pomm.

1925

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen.

Göttingen, den 20. November 1925.

Referent: Prof. Dr. Seyderhelm.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderdruck
aus „Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin", Band 48.

Sind in der Dünndarmschleimhaut Bakterienwachstum hemmende Stoffe („Bakteriostanine") nachweisbar?

Die im Gegensatz zum Dickdarm so überaus geringe Besiedelung des Dünndarms mit Bakterien und ihre vermeintlichen Ursachen sind seit längerer Zeit Gegenstand der Forschung. Von den zahlreichen Arbeiten über die Bakterienflora des Dünndarms seien nur die hauptsächlichsten erwähnt. Im übrigen sei auf die umfassende Arbeit von *van der Reis* (Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. 1925) hingewiesen.

Die ersten Untersuchungen über die Keimbesiedelung des Dünndarms wurden an Tieren vorgenommen. So stellte *Kohlbrugge*[13]) in einer Reihe von Tiersversuchen fest, daß der leere Dünndarm praktisch als steril anzusehen ist. *Rolly* und *Liebermeister*[24]) fanden beim Kaninchen, daß zwar sehr wenig Keime im Dünndarm vorhanden sind, aber doch keine absolute Sterilität herrsche. Im unteren Ileum würde sogar eine mehr oder weniger große Anzahl von Bakterien angetroffen.

Beim Menschen wurden Versuche in dieser Richtung zuerst an Säuglingen angestellt. *Escherich*[7]) beobachtete eine hochgradige Keimarmut im leeren Dünndarm des Säuglings.

Den erwachsenen Menschen zog zuerst *Höfert*[11]) in den Bereich solcher Untersuchungen. Er gewann mittels Sonde Duodenalsaft, den er auf seinen Keimgehalt prüfte. Er kam zu dem Resultat, daß der Duodenalsaft unter normalen Verhältnissen, abgesehen von ganz geringen Keimen, als steril anzusehen ist.

In neuester Zeit sind nun besonders eingehende Arbeiten auf diesem Gebiet von *Bogendörfer* und *van der Reis* erschienen.

Bogendörfer[2]) gewann mittels Duodenalsonde mit abstoßbarem Verschluß Darminhalt bei mehreren nüchternen Versuchspersonen in einer Entfernung vom Pylorus von 1—2,5 m. Die bakteriologische Untersuchung ergab das Bestehen einer ziemlich konstanten Darmflora, die aus grampositiven Enterokokken, gramnegativen Mikrokokken, aus dem der Coligruppe angehörigem Bacterium acidi lactici und grampositiven, den langen Milchsäurebacillen zuzurechnenden Stäbchen besteht.

Van der Reis[25]) untersuchte mittels der Darmpatronenmethode die einzelnen Abschnitte des Dünndarms auf ihren Bakteriengehalt bei einer Reihe nüchtern gelassener Versuchspersonen. Er stellte fest, daß der Dünndarm zwar als relativ

keimfrei, aber doch nicht als absolut steril anzusehen ist. So fand er im oberen Dünndarm grampositive Stäbchen (zu den Milchsäurebacillen gehörend), lanzettförmige Diplokokken und nur vereinzelte gramnegative Stäbchen (zur Aerogenesgruppe gehörend). Im mittleren Dünndarm wurde die Flora schon reichhaltiger: Weniger Kokken und grampositive Stäbchen, dafür mehr echte Colibacillen neben anderen gramnegativen Keimen. In den noch tiefer gelegenen Abschnitten des Dünndarms war eine weitere Zunahme der gramnegativen Bakterien zu konstatieren.

Auch über die relative Menge der vorhandenen Keime haben wir Aufschluß bekommen, so durch die Arbeit von *Bogendörfer* und *Buchholz*[3]). Diese beiden Autoren untersuchten mittels der *Ganter*schen Schlauchventilmethode eine Reihe nüchterner darmgesunder und darmkranker Versuchspersonen. Sie fanden ebenfalls eine hochgradige Keimarmut im Dünndarm Gesunder. Als Grenze des Normalen nahmen sie 5000 Keime pro 1 ccm Darmsaft an.

Welche Faktoren nun für die geringe Keimbesiedelung des Dünndarms ausschlaggebend sind, weiß man bis heute noch nicht mit Sicherheit, obwohl alle nur erdenklichen Möglichkeiten in Betracht und auch in den Bereich des Experimentes gezogen sind.

Eine Infektion des Dünndarms ist möglich oral vom Munde aus (Nahrung usw.) oder aboral durch Ascension der Bakterien vom Dickdarm aus.

Für die Vermeidung der ersteren Infektionsmöglichkeit wäre die einfachste Vorstellung die, der Salzsäure des Magens den Hauptanteil an der Vernichtung der Bakterien der Nahrung zuzuschreiben. Demgegenüber spricht *Küster*[14]) die Ansicht aus, daß im Magen keine nennenswerte Keimabtötung stattfinde, daß somit die Keimarmut des Chylus im Dünndarm durch andere Umstände bedingt sein müsse. Diese Frage erscheint durch die Untersuchungen von *Wichels*[29]) und *Meyeringh*[19]) in ein neues Licht gerückt. Die Autoren konnten feststellen, daß der Mageninhalt auch im nüchternen Zustand bei Achlorhydrie und Achylie im allgemeinen steril ist, und daß somit die Sterilität des Magens nicht allein durch die Salzsäure und die Fermente des Magens bedingt sein könne, sondern wahrscheinlich ihre Ursache in einer bactericiden Funktion der lebenden Magenwand finde. Neuerdings gibt *van der Reis* an, daß die Einwirkungsmöglichkeit und der Effekt der Salzsäure in vivo beschränkter sei, als bisher auf Grund von Vitroversuchen angenommen wurde.

Demgemäß und besonders auch der zweiten, aboralen Infektionsmöglichkeit des Dünndarms Rechnung tragend, ist es naheliegend, die Ursache seiner Keimarmut in einer Funktion des *Dünndarms* selbst zu suchen. Zunächst galt es, festzustellen, ob wirklich in den Dünndarm eingeführte Bakterien abgetötet werden.

Daß dies tatsächlich der Fall ist, konnte z. B. *Klein*[12]) beim Kaninchen nachweisen. Die aus dem Magen mit dem Futter in den Dünndarm gelangenden Bakterien starben dort ab und waren kulturell nicht mehr nachweisbar. Nach *Landsberger*[15]) wird Bac. Prodigiosus, direkt in den Dünndarm des Menschen gebracht,

dort vernichtet. Endlich gelang *Rolly* und *Liebermeister*[24]) der Nachweis, daß der Dünndarm von Kaninchen Bakterien, die in ihn direkt in nicht allzu großer Zahl eingeführt werden, zu vernichten imstande ist.

Welche Faktoren sind es aber nun, die diese keimtötende Wirkung des Dünndarms bedingen?

Der Speisebrei durcheilt den Dünndarm in verhältnismäßig kurzer Zeit. Es lag die Annahme nahe, die Keimarmut des Dünndarms einfach auf eine mechanische Reinigung zurückzuführen. Dieser Ansicht waren auch *Moro* und *Escherich*. Eine gewisse Stütze für diese Anschauung könnte man in der Angabe *Meltzers*[22]), die allerdings von *Rolly* und *Liebermeister*[24]) nicht bestätigt werden konnte, erblicken, der nachwies, daß stärkere Erschütterungen von Nachteil auf die Entwicklung verschiedener Bakterien sind.

Weiterhin wurde der Darmsaft resp. die Sekrete der großen Verdauungsdrüsen auf ihre desinfizierende Kraft untersucht.

Kohlbrugge[13]) schrieb dem Darmsaft eine große Bedeutung als Darmdesinfizienz zu. *Rolly* und *Liebermeister*[24]) untersuchten systematisch Darmsaft, Pankreassaft und Galle, konnten aber bei allen dreien keine bakterientötende Wirkung finden. Sie kamen daher zu dem Schluß, daß die Keimarmut des Dünndarms ihren Grund in einer besonderen Fähigkeit der lebenden Darmwand haben müsse. Ähnlicher Ansicht ist *Schütz*[27]), der zur Erklärung einer natürlichen Darmdesinfektion den Gewebselementen entstammende bactericide Substanzen heranzieht. *v. Mieczkowski*[20]) konnte ebenfalls im menschlichen Dünndarmsaft keinen bactericiden Stoff finden, glaubt vielmehr, ihn als guten Nährboden bezeichnen zu können. Ihm schließt sich auch *Horowitz*[10]) an, der behauptet, daß der Darmsaft und seine Komponenten das Bakterienwachstum direkt begünstigen. Außer von *Rolly* und *Liebermeister*[24]) sind noch von anderen Autoren die übrigen Verdauungssäfte, wie Pankreassaft und Galle, untersucht worden. *Falk*[8]) fand wie *Sigwart*[26]) keine bactericide Kraft im Pankreassaft. *Leubuscher*[16]) leugnet die bakterientötende Wirkung von Darm- und Pankreassaft, auch die frische Galle sei ohne antiseptische Wirkung, dagegen sollen frische Gallensäuren desinfizierend wirken, vorausgesetzt, daß auch im weiteren Verlaufe des Darmrohres Bedingungen vorhanden sind, die das Freibleiben der Säure ermöglichen. Nach Untersuchungen von *Rolly* und *Liebermeister*[24]) scheint dies aber nicht der Fall zu sein. Außer den eben genannten Autoren sprach sich noch *Macfadyen*[21]) gegen eine desinfizierende Wirkung sowohl der Galle wie des Pankreassaftes aus.

Ganz anders nun faßte *Metschnikow*[18]) die bakterienhemmende Wirkung des Dünndarms auf. Er erklärt die Abtötung der Bakterien durch phagocytierende Leukocyten, die aus den Lymphfollikeln des Darms auswandern.

Auch die Erscheinung des *Twort-d'Herelle*schen Phänomens hat man zur Erklärung der Keimarmut der oberen Verdauungswege herangezogen. *Doerr*[6]) glaubt die Bakterienarmut des Dünndarms auf die Entstehung von Lysinen in diesem Darmabschnitt zurückführen zu können, *Borchardt*[4]) will sogar aus einem Gemisch von Pankreas- und Dünndarmschleimextrakt Lysine gewonnen haben.

Endlich möge noch auf die im Jahre 1901 erschienene Arbeit von *Conradi*[5]) hingewiesen werden, der aus den verschiedensten Tierorganen, die er unter Toluol der Autolyse überließ, bakterienhemmende hitzebeständige Stoffe (wahrscheinlich Abbauprodukte der Eiweißsubstanzen) fand. Der Versuch mit Duodenalschleimhaut vom Schwein ergab eine deutliche Hemmung im Bakterienwachstum, während Jejunum und Ileum eine solche nur in sehr geringem Grade aufwiesen.

Nach all diesen Versuchen, die aber zu keiner vollkommenen Klärung der Frage über die Keimarmut des Dünndarms geführt haben, ist man in neuester Zeit wieder der bereits erwähnten Anschauung *Kohlbrugges* nähergetreten.

Ganter und *van der Reis*[8]) brachten mittels Darmpatronen Mikroorganismen, wie Bac. Prodigiosus, Staphylococcus citreus, Hefe und Bacterium coli in das Darmlumen hinein. Durch Öffnen der Patronen wurden die genannten Bakterien der Einwirkung des Darmsaftes ausgesetzt. Die Bakterien erfuhren im Dünndarm, nicht aber im Dickdarm eine Abtötung. Die genannten Autoren kamen zu dem Resultat, daß in den menschlichen Dünndarm künstlich eingebrachte darmfremde Keime unabhängig vom Füllungszustand des Darms und unabhängig von der Form der Diät abgetötet werden. Auf Grund ihrer Untersuchungen neigen sie zu der Ansicht, daß diese bactericide Kraft des Dünndarms wohl im Darmsaft zu suchen sei.

Neuerdings hat *Bogendörfer*[1]) in seiner Arbeit über Bakteriostanine die Ergebnisse obiger Autoren bestätigt.

Er gewann Darmsaft mittels eines 2—4 m langen, dünnen Gummischlauches, der von der Versuchsperson geschluckt und somit in jede beliebige Tiefe des Darmes gelangen konnte. Außerdem wurde in experimentellen Versuchen Dünndarmsaft von Hunden durch Anlegung einer Darmfistel gewonnen. Der gewonnene Darmsaft wurde dann durch ein *de Haen*sches Filter geschickt, so keimfrei gemacht und in abgestuften Mengen einer Nährbrühe zugesetzt. Dann wurde ein Kontrollröhrchen mit reiner Nährbrühe und die den Darmsaft enthaltenden Röhrchen (die Gesamtmenge in den einzelnen Röhrchen blieb stets dieselbe) mit einer gleichen Keimmenge geimpft. Für seine Versuche hat *Bogendörfer* die verschiedensten Bakterien benutzt. Es wurde die Wasserstoffionenkonzentration im Darmsaft bestimmt und Brühe mit gleicher Wasserstoffzahl benutzt. In bestimmten Zeitabschnitten wurde die Keimzahl in den einzelnen Röhrchen durch Anlegen von Zählplatten festgestellt. Aus den Resultaten solcher Versuche schließt er auf eine das Bakterienwachstum hemmende Eigenschaft des Dünndarmsaftes. Die entwicklungshemmende Kraft soll in den mittleren Darmpartien am intensivsten sein. Nach Überhitzen über 60° sei der Darmsaft unwirksam.

Ausgehend von der Voraussetzung, daß die Sekrete der großen Verdauungsdrüsen keine bakterienhemmende Wirkung entfalten, schloß *Bogendörfer*, daß die im Dünndarmsaft gefundenen bactericiden Substanzen ein Sekret der Dünndarmschleimhaut darstellen und also auch im Epithel des Dünndarms nachzuweisen sein müßten.

Er gewann daher vom Tier Dünndarmschleim, der auf verschiedene Art dann weiter behandelt wurde. Einmal wurde die Schleimhaut mit physiologischer Kochsalzlösung verrieben, filtriert, und das sterile Filtrat dann in der oben angegebenen Weise Nährbrühe zugesetzt. Die Versuchsröhrchen wurden dann beimpft und die Keimzahlen bestimmt. Hierbei zeigte sich nur eine sehr geringe Wirkung auf das Bakterienwachstum. Intensiver wirkten Alkokol-, Äther-, Aceton- oder Benzolextrakte der Dünndarmschleimhaut, die, nachdem das Extraktionsmittel bei einer

Temperatur von 50° vorsichtig abgedampft war, in Nährbrühe gelöst und in der erwähnten Weise weiter behandelt wurden. Ebenso wie die Hemmungsstoffe des Darmsaftes erwiesen sich auch die im Schleimhautextrakt enthaltenen als äußerst thermolabil. Im einzelnen ergab sich, daß die mittleren Partien des Dünndarms am reichsten an Hemmungsstoffen waren, während die Schleimhaut des Dickdarms solche überhaupt nicht aufwies. Dasselbe beobachtete er bei Menschen mit pathologisch reicher Darmflora. Ferner erwiesen sich nach Verabreichung von die Darmschleimhaut schädigenden Mitteln (Podophyllin) sowohl der Dünndarmsaft des Menschen wie Dünndarmschleimextrakte von Tieren als äußerst arm an Hemmungsstoffen.

Zusammenfassend kommt *Bogendörfer* zu dem Schluß, daß die im Dünndarmsaft nachweisbaren Hemmungsstoffe den Darmepithelien entstammen und lipoidlösliche extrahierbare Substanzen darstellen. In ihnen müsse man die die Keimarmut des Dünndarms bedingenden Faktoren sehen. Er legt diesen Stoffen den Namen „Bakteriostanine" bei.

In Anbetracht der Bedeutung, die die Klärung der Frage über die Ursache der relativen Keimarmut des Dünndarms haben würde, habe ich auf Veranlassung von Herrn Prof. *Seyderhelm* eine Nachprüfung der von *Bogendörfer* gewonnenen Ergebnisse durchgeführt. Ich wurde hierbei im bakteriologisch-technischen Teil von Herrn Dr. *Wichels* in dankenswerter Weise unterstützt.

Die *vorliegenden Versuche* beschränken sich allerdings lediglich auf die Nachprüfung der Wirkung von *Darmschleimhaut*extrakten. Der *Darmsaft* ist nicht in den Kreis der Untersuchungen mit einbezogen worden.

In großen Zügen war die Art der *angewandten Versuchsanordnung* folgende:

Als Ausgangsmaterial wurde Dickdarm- und Dünndarmschleimhaut, in einigen Versuchen auch Magenschleimhaut des *Hundes* und des *Schweines* benutzt. Sofort nach Tötung des Tieres wurde ein Stück des zu untersuchenden Darmabschnittes reseziert, mehrfach durchgespült, bis es frei von etwaigen Kotresten war, darauf aufgeschnitten und auf einer Glasplatte ausgebreitet. Die Gewinnung der Mucosa gelang leicht durch Abschaben mittels eines Rasiermessers. Nach Bestimmung des Gewichtes wurde der so gewonnene Schleim im Mörser fein zerrieben (bei Dickdarmschleimhaut war oft noch ein Zusatz von Seesand nötig), in ein Schüttelglas getan und mit einer bestimmten Menge des jeweiligen Extraktionsmittels versetzt. Als Extraktionsmittel wurde vorzüglich Benzol benutzt, daneben auch Äther, Tetrachlorkohlenstoff, Alkohol und Benzin. In einem Versuch wurde lediglich mit physiologischer Kochsalzlösung geschüttelt. Beim Abschluß der Versuche wurde auch einmal frische Magen- und Dünndarmmucosa verwandt. Die Gläser wurden darauf im Schüttelapparat etwa 5 Stunden geschüttelt. Es resultierte dann meist ein dickmilchiges Gemenge. Durch Filtrieren wurden die festen Substanzen entfernt, die durchtropfende opalescierende Flüssigkeit in einem Porzellanschälchen aufgefangen. Die Extraktionsflüssigkeit wurde vorsichtig durch Abdampfen unter 50° entfernt, worauf in dem Schälchen eine bräunliche, fettartige Masse zurückblieb.

Bei einigen Versuchen wurde mit einem Extraktionsapparat (Soxleth) gearbeitet. Dazu wurde die Darmschleimhaut erst mit Gips längere Zeit verrieben,

bis man eine annähernd trockene Masse erhielt, die in die Extraktionshülse getan wurde. Aus der Reihe der sonst verwandten Extraktionsmittel konnte hierbei leider nur der Äther zur Anwendung kommen, da der Siedepunkt der übrigen (Benzol, Alkohol) oberhalb der von *Bogendörfer* angegebenen kritischen Temperatur (60°) liegt. Die Anwendung des Extraktionsapparates bot den Vorteil, die Darmschleimhaut längere Zeit hindurch, ohne daß der Apparat einer besonderen Bedienung bedarf, der Einwirkung des Extraktionsmittels aussetzen zu können. Es wurde so meist 2—3 Tage extrahiert. Nach Abdunsten des Äthers blieb, wie bei der Schüttelmethode, eine bräunliche, fettartige Masse zurück, allerdings an Menge viel reichlicher. Da das Abdunsten des Extraktionsmittels bei allen Versuchen unter genauer Kontrolle der Temperatur längere Zeit hindurch fortgesetzt wurde, war die Gewähr gegeben, das Extrakt vollkommen von jenem befreit zu erhalten.

Der auf diese oder jene Weise gewonnene Rückstand wurde in einem Teile der Fälle in einer bestimmten Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und zwecks besserer Verteilung in einem sterilen Schüttelglas noch einige Zeit geschüttelt. Die Extraktaufschwemmung wurde gleichen Teilen von Bouillon oder Galle zugefügt (Verdünnung 1: 1), zur Kontrolle wurde ein Röhrchen nur mit Extraktaufschwemmung beschickt, einem anderen Bouillon- oder Galleröhrchen, um dieselbe Verdünnung wie in dem Extraktgemisch zu erhalten, gleiche Mengen physiologischer Kochsalzlösung zugefügt. Die Gesamtmenge der einzelnen Gemische war in derselben Versuchsserie die gleiche und betrug etwa 3 bis 5 ccm. In einem anderen Teile der Versuche wurde der gesamte gewonnene Rückstand in Bouillon aufgeschwemmt, als Kontrolle ein Röhrchen mit derselben Menge einfacher Bouillon angesetzt.

In diese Versuchsröhrchen wurden dann Bakterien eingesät. Es wurden lediglich Reinkulturen von Bacterium coli benutzt, das aus dem Dickdarm vom Hund gezüchtet wurde. Für jeden einzelnen Versuch dienten die Keime einer 24stündigen Schrägagarkultur. Im einzelnen wurde dabei folgendermaßen vorgegangen: Das Schrägagarröhrchen wurde mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt und vorsichtig durchgeschüttelt, um die Bakterien vom Agar zu lösen. Diese Bakterienaufschwemmung wurde dann zwecks gleichmäßiger Verteilung durch ein Hartfilter in ein steriles Reagensgas filtriert, bis von diesem gerade die Kuppe ausgefüllt war. Der übrige Teil des Röhrchens wurde mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Von dieser so verdünnten Bakterienaufschwemmung wurde mittels Mikropipette 0,1 ccm in jedes der oben erwähnten Versuchsröhrchen getan. Die Röhrchen wurden darauf in den Brutschrank gestellt und in verschiedenen Zeitabständen Platten gegossen (0,1 ccm aus jedem der Röhrchen in je 10 ccm 47° heißen Agars). Nach 24stündigem Verweilen der Platten im Brutschrank wurde die Kolonienzählung vorgenommen. Die unten angegebenen Ziffern beziehen sich auf die Kolonienzahl der ganzen Agarplatte.

Um über die Quantität und Qualität der vermuteten und nach den Untersuchungen *Bogendörfers* zu erwartenden bactericiden oder wenigstens die Entwicklung der Bakterien hemmenden Substanzen des Dünndarmextraktes im großen und ganzen Klarheit zu gewinnen, wurden vorerst einige Tastversuche angestellt.

1. *Versuchstier Hund.*

a) 50 g Dünndarmmucosa mit 500 ccm physiologischer Kochsalzlösung 5 Stunden geschüttelt.

Dann wurden mit Bouillon steigende Verdünnungen hergestellt (Gesamtmenge 10 ccm), und zwar 1: 10, 1: 20 und 1: 40, als Kontrolle 10 ccm reiner Bouillon, ferner 10 ccm der reinen Schüttellösung.

In jedes der 5 Röhrchen kamen 0,1 ccm der Bakterienaufschwemmung. Von jedem Röhrchen wurde je eine Öse entnommen und auf je einer Endoagarplatte Strichkulturen angelegt.

Dies wurde vorgenommen: gleich nach Fertigstellung der Röhrchen, nach 2 Std. Bebrütung, nach 4 Std. Bebrütung, nach 6 Std. Bebrütung. Resultat: Nach 24stündiger Belassung der Endoagarplatten im Brutschrank bestanden keine Unterschiede zwischen den Kulturen der einzelnen Platten, kein Unterschied zwischen den auf jeder einzelnen Platte in den verschiedenen Zeitabschnitten vorgenommenen Strichkulturen.

b) 25 g Dünndarmmucosa mit 250 ccm Benzol 5 Stunden geschüttelt, Benzol durch Abdampfen entfernt.

Rückstand mit 50 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, mit Bouillon wie vorhin steigende Verdünnungen hergestellt. Weitere Versuchsanordnung gleichfalls wie vorhin.

Resultat: Auf der Endoplatte, die von dem nur reine Extraktaufschwemmung enthaltenden Röhrchen beimpft war, waren nur spärliche Keime gewachsen. Die übrigen wiesen nichts Besonderes auf.

2. *Versuchstier Hund.*

a) 15 g Dünndarmmucosa mit 100 ccm Äther 5 Stunden geschüttelt. Äther durch Abdampfen entfernt.

Rückstand mit 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Dann genau wie vorhin mit Bouillon steigende Verdünnungen hergestellt, weitere Versuchsanordnung ebenfalls wie vorhin.

Resultat: Kein Unterschied zwischen den einzelnen Platten, kein Unterschied zwischen den Strichkulturen einer Platte.

b) 3 g Dickdarmmucosa mit 50 ccm Äther 5 Stunden geschüttelt. Äther durch Abdampfen entfernt, Rückstand mit 6 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Weiter wie bei a).

Resultat wie bei a).

Anmerkung: Bei diesem Versuch wurde auch Benzin als Extraktionsmittel verwandt. Nach dem Schütteln resultierte aber eine dicke Gallerte, die zum Versuch nicht zu gebrauchen war.

Aus diesen Vorversuchen geht hervor, daß eine bactericide Wirkung einer Aufschwemmung von Dünndarmschleimhautextrakt nicht so intensiv ist, daß sie bereits nach einer Bebrütung von 6 Stunden und unter Anwendung einer Methode, die nur grob sichtbare Resultate deutlich werden läßt, zutage tritt. Von einer Verdünnung der Aufschwemmung in Bouillon von 1 : 10 usw. war dann natürlich bei solcher Versuchsanordnung erst recht kein positives Resultat zu erwarten.

Im Gegensatz zu diesem Resultat schien die Benzolextraktion der Dünndarmmucosa nicht nur hemmende, sondern stark bactericide Eigenschaften zu entfalten. Auf Grund der später erwähnten Kontrollversuche, die mit der Zählmethode gewonnen sind, ist aber dieses Resultat wohl nicht einer bactericiden Fähigkeit des Extraktes zuzuschreiben, sondern wahrscheinlich durch eine nicht genügende Abdünstung des Benzols zu erklären. Die desinfizierende Kraft des Benzols ist bekannt und außerdem in einigen eigenen Kontrollversuchen bestätigt.

Die nun folgenden Versuche sind mit der Zählmethode ausgeführt. Sie hatten zum Zweck, einmal die bisherigen Resultate mit genauerer Methodik zu kontrollieren, andererseits in quantitativer Beziehung das positive Resultat der Benzolextrakte auszuwerten. Die Zählmethode war außerdem geeignet, nicht nur eine mögliche bactericide Wirkung, sondern auch eine entwicklungshemmende Wirkung der Dünndarmschleimhaut zu prüfen.

Versuchstier Hund.

a) 15 g Dünndarmmucosa mit 100 ccm Tetrachlorkohlenstoff, 3,5 Dickdarmmucosa mit 50 ccm Tetrachlorkohlenstoff 5 Stunden geschüttelt, Tetrachlorkohlenstoff durch Abdampfen entfernt, Rückstand aufgeschwemmt in 15 ccm resp. 3,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung.

Herstellung von Versuchsröhrchen:

1. $1^1/_2$ ccm Galle + $1^1/_2$ ccm physiol. Kochsalzlösung + 0,1 ccm Bakterienaufschwemmung;
2. $1^1/_2$ ccm Galle + $1^1/_2$ ccm Extraktaufschwemmung (Dünndarm) + 0,1 ccm Bakterienaufschwemmung;
3. $1^1/_2$ ccm Extraktaufschwemmung (Dünndarm) + 0,05 ccm Bakterienaufschwemmung;
4. $1^1/_2$ ccm Galle + $1^1/_2$ ccm Extraktaufschwemmung (Dickdarm) + 0,1 ccm Bakterienaufschwemmung;
5. $1^1/_2$ ccm Extraktaufschwemmung (Dickdarm) + 0,05 ccm Bakterienaufschwemmung.

Nach Fertigstellung der Röhrchen und nach 24stündiger Bebrütung wurden Platten gegossen.

Resultat: Kolonienzahlen entsprechend den einzelnen Röhrchen:

	vor Bebrütung	nach 24 St.		vor Bebrütung	nach 24 St.
1.	13200	∞	4.	9800	∞
2.	14000	∞	5.	8000	∞
3.	12800	∞			

Es war demnach weder eine bactericide, wie aus den Testversuchen zu erwarten, noch eine entwicklungshemmende Wirkung des Dünn- oder des Dickdarmschleimhautextraktes festzustellen.

Um nicht durch die Interferenz etwaiger in der Extraktaufschwemmung vorhandene Bakterien eine Störung der Versuche befürchten zu müssen, wurde die Extraktaufschwemmung beim folgenden Versuch noch durch eine Berkefeldtkerze geschickt.

Ausgangsmaterial bildete die Dünndarmschleimhaut des vorigen Versuchstieres. Es wurden 15 g Dünndarmmucosa mit 100 ccm Benzol extrahiert, das Benzol bei 50° abgedampft und der Rückstand in 15 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen.

Ergebnis:

	ausgez. Kolonien: vor Bebr.	nach 2 Std.	nach 15 Std.
1. $1^1/_2$ ccm Galle + $1^1/_2$ ccm E.A.*) + 0,1 ccm B.A.**)	820	930	0
2. $1^1/_2$ ccm Galle + $1^1/_2$ ccm physiolog. Kochsalzlösung + 0,1 ccm B.A.	730	800	1980000
3. $1^1/_2$ ccm E.A. + 0,05 ccm B.A.	780	32	0

*) E.A. = Extraktaufschwemmung. **) B.A. = Bakterienaufschwemmung.

Es zeigte sich also, daß dieser Benzolextrakt eine starke bactericide Fähigkeit entfaltete. Nach 15stündiger Bebrütung war sowohl die Extraktaufschwemmung allein wie auch die mit Galle vermischte Aufschwemmung steril. Das Kontrollröhrchen wies die übliche Vermehrung der Keime auf.

Zur Kontrolle dieses Resultates wurden Benzolextrakte von der Dünn- und Dickdarmmucosa von 4 weiteren Hunden und 3 Schweinen (teils durch Berkefeldtkerze filtriert, teils unfiltriert) hergestellt. Überraschenderweise wurde in allen diesen Versuchen weder eine bactericide noch eine entwicklungshemmende Wirkung festgestellt.

Aus gleichsinnigen Resultaten sei ein Beispiel angeführt:

		ausgez. Kolonien:	
1. Dünndarmextrakt.	vor Bebr.	nach 4 Std.	nach 15 Std.
Galle + E.A. + B.A.	384	15840	∞
Galle + 0,9proz. NaCl + B.A.	576	15458	∞
EA. + B.A.	484	23040	∞
2. Dickdarmextrakt.			
Galle + E.A. + B.A.	320	12960	∞
E.A. + B.A..	576	20100	∞

Die Kontrollversuche ergaben, daß die Benzolextrakte nicht nur nicht eine entwicklungshemmende Eigenschaft entfalteten, sondern im Gegenteil allem Anschein nach den Bakterien als guter Nährboden dienten.

Es bestanden verschiedene Möglichkeiten der Erklärung.

Einmal konnte man für das abweichende Resultat individuelle Schwankungen der bactericiden Fähigkeiten der Darmschleimhaut der einzelnen Tiere vermuten. Derartige individuelle Schwankungen treten uns ja bei allen biologischen Reaktionen entgegen. Eigentümlich erscheint allerdings, daß nur 2 Benzolextrakte bactericid wirkten, während 7 Kontrollen das Bakterienwachstum vollkommen unbeeinflußt ließen.

Es mußte demnach nach anderen Gründen für den Ausfall der Versuche gefahndet werden. Es bestand die Möglichkeit, daß durch die Filtration des ersten Extraktes analog den *d'Herelle*schen Versuchen am Ruhrstuhl ein lysinogenes Agens im Extrakt aufgetreten wäre. Wie anfangs schon erwähnt, konnte *Borchardt* aus Dünndarm- und Pankreasextrakten sog. Bakteriophagen gewinnen. Aber auch die filtrierten Extrakte der Kontrollen zeigten keine lysinogenen Fähigkeiten.

Es erschien schließlich möglich, daß in den beiden positiven Versuchen eine restlose Abdampfung des Benzols nicht geglückt war und bei der bekannten bactericiden Wirkung desselben Reste in dem syrupartigen Rückstand geblieben sind.

Nach einigen eigenen Versuchen wirken schon sehr minimale Mengen von dem Nährboden zugesetzten Benzol bactericid. Der mit physio-

logischer Kochsalzlösung aufgenommene Rückstand *vollständig* verdampften Benzols zeigt eine solche Wirkung allerdings nicht. Ferner wurde noch feingeschabtes Kaninchenfleisch mit Benzol extrahiert und das Benzol *vollständig* verdampft. Der mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommene Rückstand hatte keine hemmende Wirkung.

Man kann demnach wohl behaupten, daß auch die Benzolextrakte der Dünndarmschleimhaut weder bactericide noch bakterienhemmende Eigenschaften aufweisen. Die beiden positiven Resultate sind allem Anschein nach durch Versuchsfehler infolge nicht vollkommen verdampften Benzols zurückzuführen.

Die negativen Resultate, die bei den bisherigen Versuchen, bei denen das Extrakt mittels Schüttelns gewonnen wurde, erzielt wurden, führten dazu, wie bereits erwähnt, mit dem Extraktionsapparat zu arbeiten. Denn man konnte immerhin daran denken, daß längeres Einwirken des Extraktionsmittels auf das Untersuchungsmaterial für die Gewinnung der gesuchten Stoffe von Vorteil sein konnte.

Als Extraktionsmittel wurde aus dem bereits erwähnten Grunde Äther benutzt. Ausgangsmaterial bildete Dünndarmmucosa vom Schwein. Der nach Abdunsten des Äthers gewonnene Rückstand wurde in der üblichen Weise in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und in der bekannten Versuchsanordnung verwandt.

Auch bei diesem Versuche konnten keine wachstumshemmenden Stoffe nachgewiesen werden.

Es wurde dann noch ein Versuch mit dem Extraktionsapparat angeschlossen. Nur wurde der Rückstand anders behandelt. Bei den bisherigen Versuchen wurde immer nur ein Teil einer Aufschwemmung von Schleimhautextrakten benutzt. Es lag daher nahe, zu versuchen, ob eine bactericide oder hemmende Wirkung nicht doch vielleicht zutage träte, wenn man das gesamte erhaltene Extrakt in möglichst konzentrierter Form auf die gleiche Menge Bakterien, wie bisher, einwirken ließ. Es wurde deshalb der gesamte erhaltene Rückstand in so geringer Menge von Nährbouillon aufgeschwemmt, wie zur vollständigen Aufnahme nötig war (3 ccm). Als Kontrolle wurde ein Röhrchen mit 3 ccm reiner Bouillon angesetzt.

Es war kein Unterschied in dem Wachstum der Bakterien, auch nach 12stündiger Bebrütung in beiden Röhrchen festzustellen.

Also auch in dieser Form gelang es nicht, ein positives Resultat zu erzielen.

Man konnte erwägen, ob analog den Untersuchungen *Seyderhelms*[28a]) über die Coligifte vielleicht in einer bestimmten Fraktion des Dünndarmextraktes wachstumshemmende Stoffe vorhanden seien.

Es wurde deshalb folgender Versuch ausgeführt: 50 g Dünndarmmucosa vom Schwein wurden mit 200 ccm 50proz. Alkohols 5 Stunden geschüttelt. Das Ganze wurde dann in 200 ccm absoluten Alkohols hineinfiltriert, wobei sich ein weißer, flockiger Niederschlag bildete. Durch Filtrieren mittels eines Hartfilters wurde der Niederschlag abgefangen. Nach Trocknung wurde Filter samt Rückstand in einem sterilen Glas mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung mehrfach durchgeschüttelt, bis eine milchig-trübe Flüssigkeit resultierte (Röhrchen 1). Der

von dem Niederschlag befreite Alkohol wurde sehr sorgfältig durch Abdampfen entfernt, wobei wieder der bekannte bräunliche Rückstand übrig blieb, der in 10 ccm Bouillon aufgeschwemmt wurde (Röhrchen 2). Nach Bakterienzusatz zu beiden Röhrchen wurden Platten gegossen. Auch nach 12stündiger Bebrütung wiesen die Keimzahlen der entsprechenden Agarplatten keinen wesentlichen Unterschied auf.

Also auch der auf diese Weise noch reiner gewonnene Extrakt erwies sich als völlig unwirksam.

Lediglich zur Vervollständigung der ganzen Versuchsreihe dienten die beiden Abschlußversuche. Einmal wurde Benzolextrakt aus Magenschleimhaut, ferner frische Magen- und Dümmdarmschleimhaut des Hundes auf das Vorhandensein von Bakteriostaninen geprüft.

Der aufgeschnittene Magen wurde durch Abspülen peinlichst gesäubert, die gewonnene Schleimhaut mit Benzol geschüttelt, das Extrakt in Bouillon aufgeschwemmt. Als Kontrolle diente ein Röhrchen mit der gleichen Menge reiner Bouillon.

Resultat war, daß auch Extrakt von Magenschleimhaut sich als unwirksam erwies.

Bei dem letzten Versuch schließlich wurden je 5 g Magen- und Dünndarmschleimhaut vom Hund mit je 40 ccm Bouillon im sterilen Schüttelglas kräftig durchgeschüttelt und die erhaltene Emulsion in bekannter Weise geprüft. Nach 17stündiger Bebrütung wiesen die Keimzahlen der entsprechenden Agarplatten nebst der Kontrolle keinen wesentlichen Unterschied untereinander auf.

Das gleiche negative Resultat wurde also auch bei der Verwendung frischer Magen- und Dünndarmschleimhaut erzielt.

Es geht aus diesen Untersuchungen wohl hervor, daß mittels einer Methodik, die zum Teil mit der von *Bogendörfer* benutzten identisch ist, zum Teil von ihr abweicht, bactericide oder das Wachstum hemmende Wirkungen nicht nachgewiesen werden konnten.

Es sei gestattet, mit kurzen Worten auf die gegenteiligen Resultate *Bogendörfers* einzugehen.

Die von *Bogendörfer* angeführten Protokolle (S. 641 und 646) sind leider nicht so ausführlich, daß man aus ihnen ein genaues Bild der Resultate gewinnen kann. Insbesondere wird die Angabe über die Anzahl der Keime, die vor der Bebrütung in den einzelnen Vergleichsröhrchen enthalten waren, vermißt. Es ist bei der heutigen Technik unmöglich, auch bei der Verwendung von vollkommen homogenen Aufschwemmungen und mit Capillarpipetten, stets eine auch nur ungefähr gleiche Menge von Bakterien abzumessen. Die von *Bogendörfer* angegebenen Unterschiede liegen m. E. durchaus noch innerhalb der Fehlergrenze. Ein einigermaßen genaues Resultat ist nur dann zu erwarten, wenn man die *vor* der Bebrütung in den einzelnen Versuchsröhrchen enthaltenen Keimzahlen kennt und mit den nach verschiedener Bebrütungszeit zu ermittelnden vergleichen kann. Immerhin ist auffällig, daß *Bogendörfer* in allen seinen Versuchen eine geringere Keimzahl in der

mit Dünndarmextrakt versehenen Bouillon erzielen konnte. Aus dieser Tatsache allein scheint er die bakterienhemmende Wirkung des Extraktes herleiten zu wollen.

Eine Erklärung der von *Bogendörfer* erzielten Resultate erscheint aus dem schon angegebenen Grunde unmöglich. Die vorliegenden Versuche können die Resultate *Bogendörfers* nicht bestätigen, im Gegenteil erwies sich auch der reine Dünndarmextrakt nicht nur nicht als bactericid oder das Wachstum von Colibacillen hemmend, er stellte sogar einen ausgezeichneten Nährboden für diese Bakterienart dar, der sich häufig von einer guten Nährbrühe nicht unterschied.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit hatten nur zum Ziele, den etwaigen Nachweis wachstumshemmender Stoffe der Dünndarmschleimhaut oder ihrer Extrakte zu führen. In jüngster Zeit ist eine Arbeit von *Prausnitz* und *van der Reis*[23]) erschienen, die die hemmende Wirkung auch des Darm*saftes* als Ursache der relativen Keimarmut des Dünndarms in Frage zieht.

Jedenfalls blieb bei 24 unter 40 Patienten jede hemmende Wirkung des Darminhalts auf zugesetzte Bakterien (Typhus-, Paratyphus B-, Coli-, Ruhr Shiga-, Ruhr Flexner- und Ruhr Y-Bakterien) aus. Eine hemmende Wirkung auf Colibacillen wurde nur einmal festgestellt.

Wenn auch die Resultate nicht mittels der Zählmethode gewonnen sind, sondern nur die Intensität der Trübung der Bouillonkultur als Maßstab genommen wurde, so glauben die Autoren sich doch zu dem Schluß berechtigt, daß die hemmende Wirkung des Darmsaftes nicht regelmäßig gegenüber den untersuchten Bakterien auftritt.

Endlich sei hier noch angeführt, daß klinische Versuche von *Lucksch*[17]) und *Mahler* durch Verfütterung von pulverisierter Dünndarmschleimhaut des Schweins (Präparat von Prof. *Wiechowski*) und Duodenalsaft darmgesunder Patienten bei Kranken mit perniziöser Anämie weder Rückgang der Dünndarmflora noch Besserung des klinischen Befundes ergeben haben.

Aus diesen Ausführungen und aus den Resultaten dieser und anderer Untersuchungen ist wohl zu entnehmen, daß wir von der Lösung der Frage nach der Ursache der relativen Keimarmut des Dünndarms noch weit entfernt sind.

Zusammenfassung.

1. Es gelang nicht, in mittels verschiedenster Extraktionsmethoden gewonnenen Magen- und Dünndarmschleimhautextrakten von Hund und Schwein bactericide oder wachstumshemmende Stoffe nachzuweisen.

2. Sowohl die Extrakte als auch die Emulsion der Dünndarmschleimhaut stellen im Gegenteil im allgemeinen einen guten Nährboden für Colibakterien dar.

3. Die relative Keimarmut des normalen Dünndarms ist demnach nicht durch sog. Bakteriostanine *Bogendörfers* zu erklären, sondern wahrscheinlich als eine in ihrer Natur noch unbekannte Funktion der lebenden normalen Darmwand im Sinne von *Rolly*, *Liebermeister*[24]) und *Seyderhelm*[28b]) aufzufassen.

Literaturverzeichnis.

[1]) *Bogendörfer:* Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **41**, H. 4/6. — [2]) *Bogendörfer:* Dtsch. Arch. f. klin. Med. **140**, H. 5/6. 1922. — [3]) *Bogendörfer* und *Buchholz:* Dtsch. Arch. f. klin. Med. **142**. 1923. — [4]) *Borchardt:* Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 7. — [5]) *Conradi:* Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **1**, H. 5 u. 6. 1901. — [6]) *Doerr:* Schweiz. Med. Wochenschr. **53**. 1923. — [7]) *Escherich:* Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehung zur Physiologie der Verdauung. Stuttgart 1886. — [8]) *Falk:* Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **93**, H. 2. 1883. — [9]) *Ganter* und *van der Reis:* Dtsch. Arch. f. klin. Med. **137**, H. 5 u. 6. 1921. — [10]) *Horowitz:* Über die Bakterien des Verdauungstraktus beim Hund. Zeitschr. f. physiol. Chem. **52**, 95. — [11]) *Höfert:* Zeitschr. f. klin. Med. **92**. — [12]) *Klein:* Arch. f. Verdauungskrankh. **8**, 50. — Die physiologische Bakterienflora des Darmkanals. Arch. f. Hyg. **45**, 117. — [13]) *Kohlbrugge:* Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. und Infektionskrank. **29/30**. 1901. — [14]) *Küster:* Die Bedeutung der normalen Darmbakterien für den gesunden Menschen *(Kolle* und *Wassermann)*. Bd. 6. — [15]) *Landsberger:* Über den Bakteriengehalt des Darmkanals und die Bactericidie der Darmsäfte. Inaug.-Diss. Königsberg 1903. — [16]) *Leubuscher:* Zeitschr. f. klin. Med. **17**. — [17]) *Lucksch:* Med. Klin. 1925, S. 1200. — [18]) *Metschnikow:* Immunität bei Infektionskrankheiten. Jena 1902. — [19]) *Meyeringh:* Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chir. 1924. — [20]) *v. Mieczkowski:* Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chir. **9**. 1902. — [21]) *Macfadyen:* Journ. of anat. a. physiol. **21**. — [22]) *Meltzer:* Über die fundamentale Bedeutung der Erschütterung für die lebende Materie. Zeitschr. f. Biol. **12**, 464. 1894. — [23]) *Prausnitz* und *van der Reis:* Dtsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 8. — [24]) *Rolly* und *Liebermeister:* Dtsch. Arch. f. klin. Med. **83**. 1905. — [25]) *van der Reis:* Klin. Wochenschr. **19**. 1922. — [26]) *Sigwart:* Über die Einwirkung der proteolyt. Fermente Pepsin und Trypsin auf Milzbrandbacillen. Diss. Tübingen. — [27]) *Schütz:* Berlin. klin. Wochenschr. 1900, Nr. 25. — [28a]) *Seyderhelm:* Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **21**, 361. 1922; b) Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 14, S. 568. — [29]) *Wichels:* Zeitschr. f. klin. Med. **100**, 335. 1925.

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.